

**MANNICH BASE OF TETRACYCLINE AND POLYPEPTIDES**

Patent Number:  US3814746  
Publication date: 1974-06-04  
Inventor(s): DE BARBIERI A  
Applicant(s): INST SIEROTERAPICO MILANESE SE  
Requested Patent:  FR2101226 ←  
Application Number: US19700094950 19701203  
Priority Number(s): IT19700028334 19700805  
IPC Classification: C07C103/52; C07C103/19  
EC Classification: C07K5/08T  
Equivalents:  GB1329869

---

**Abstract**

---

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) **N° de publication :**  
(A utiliser pour  
le classement et les  
commandes de reproduction.)

**2.101.226**

(21) **N° d'enregistrement national :**  
(A utiliser pour les paiements d'annuités,  
les demandes de copies officielles et toutes  
autres correspondances avec l'I.N.P.I.)

**71.06426**

## (13) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

1<sup>re</sup> PUBLICATION

(22) Date de dépôt..... 25 février 1971, à 14 h 43 mn.

(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande ..... B.O.P.I. — «Listes» n. 13 du 31-3-1972.

(51) Classification internationale (Int. Cl.) .. A 61 k 27/00//C 07 c 103/00.

(71) Déposant : ISTITUTO SIEROTERAPICO MILANESE «SERAFINO BELFANTI» ENTE  
MORALE, résidant en Italie.

Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet L. A. de Boisse.

(54) Dérivés de la tétracycline et de peptides synthétiques à action antitumorale.

(72) Invention de :

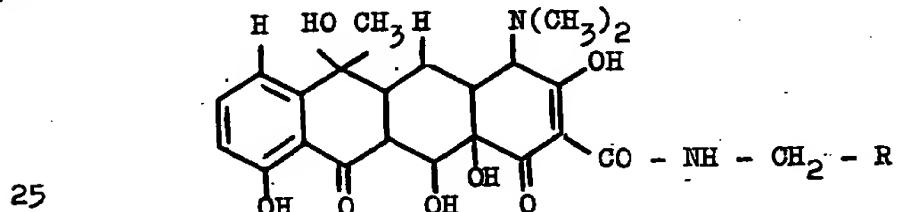
(33) (32) (31) Priorité conventionnelle : *Demande de brevet déposée en Italie le 5 août 1970,  
n. 28.334 A/70 au nom du demandeur.*

L'invention concerne des dérivés de tétracyclin et de peptides synthétiques qui ont une activité notable dans le domaine de la chimiothérapie antitumorale, ainsi que des procédés pour leur préparation.

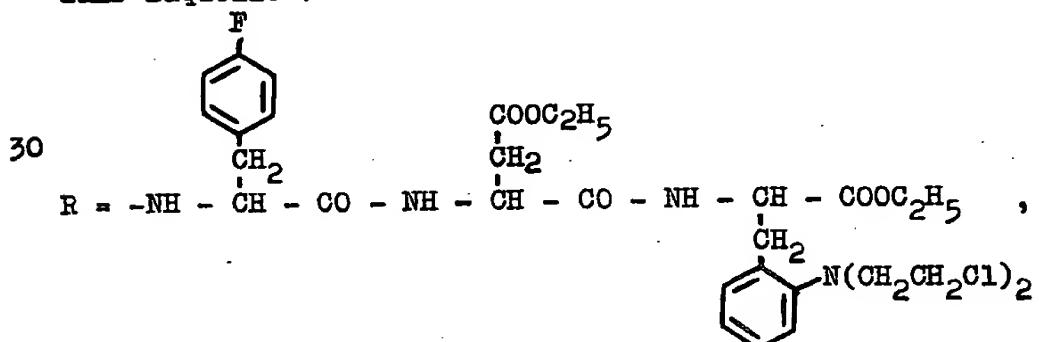
5 La chimiothérapie antitumorale a fait l'objet de nombreuses recherches intensives dans le monde entier ces dernières années. Il faut reconnaître que l'on a obtenu certains résultats partiels; cependant, la chimiothérapie idéale n'a pas encore été découverte. Cela justifie des efforts continus 10 pour préparer de nouveaux composés doués d'activité antitumorale. En tenant compte de la localisation bien connue de la tétracycline dans les tissus tumoraux et, en outre, de la forte activité antitumorale de certains peptides synthétiques contenant un reste de m-di-(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanine, 15 on a obtenu des composés en condensant la tétracycline avec un éther d'un tel peptide antitumoral en vue d'obtenir une meilleure sélectivité de l'activité chimiothérapeutique.

L'invention concerne des composés répondant à la formule générale :

20



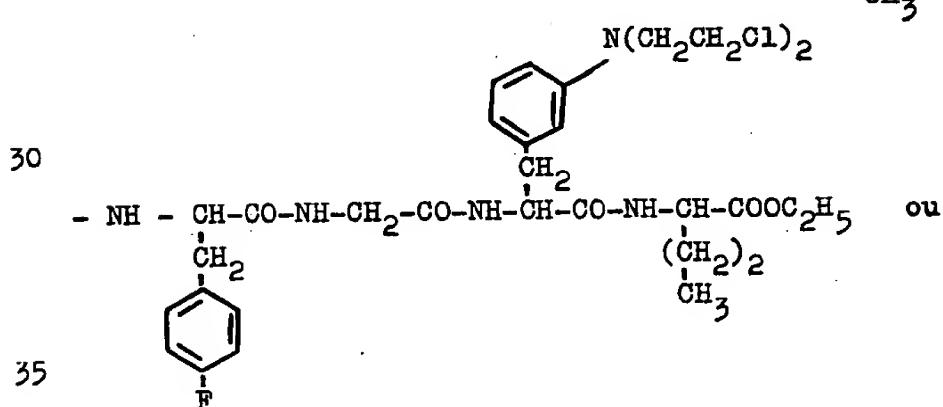
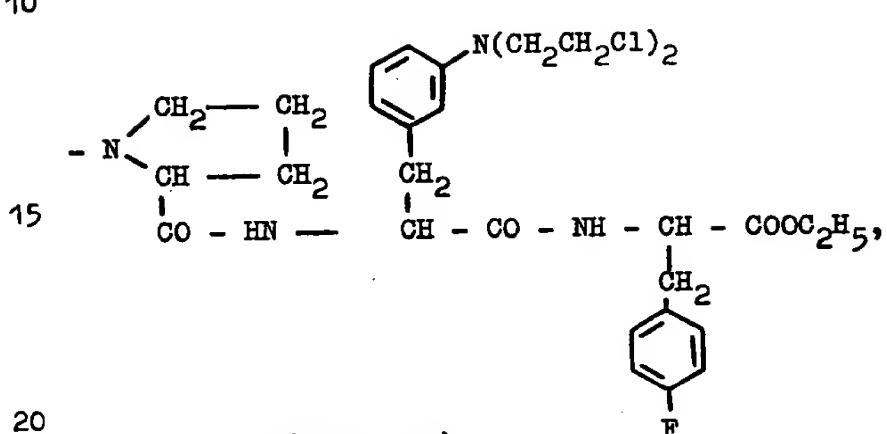
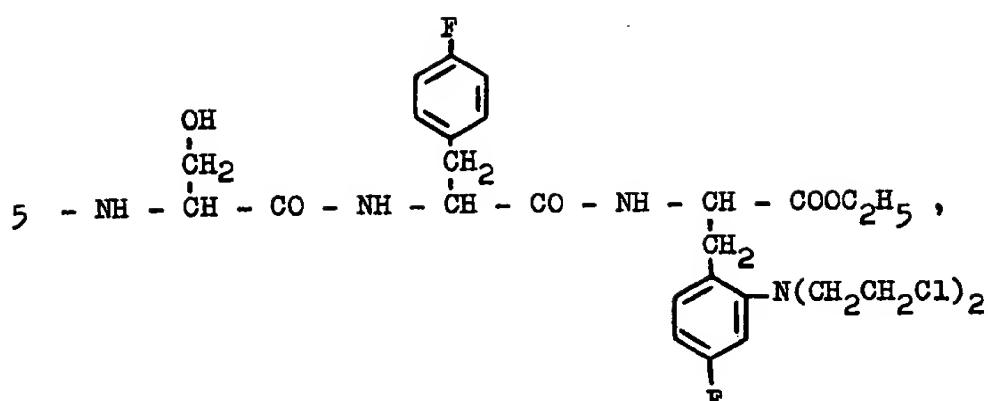
dans laquelle :

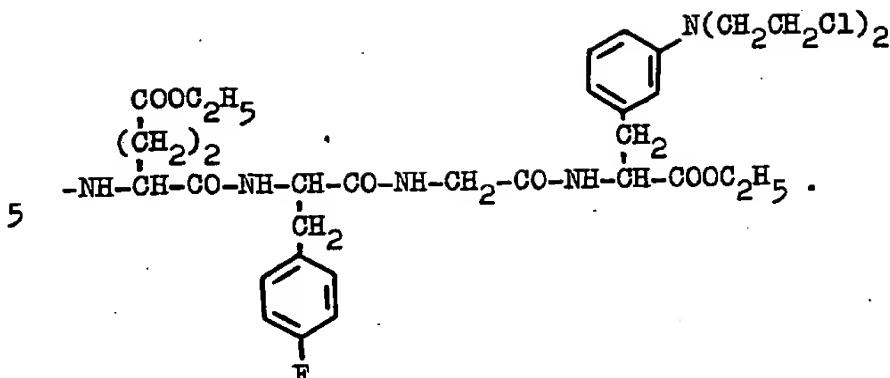


71 06426

2

2101226





10 On a trouvé que des mélanges des composés qui rentrent dans la formule générale ont une efficacité élevée.

La formule générale indiquée plus haut représente une molécule de tétracycline dans laquelle la fonction carboxamide est reliée par un groupe méthylène au(x) groupe(s) amino libre(s) d'un ester (méthylique ou éthylique) d'un peptide dans lequel au moins un constituant aminoacide est une molécule de m-di-(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanine.

Les conditions fondamentales sont les suivantes :

1) les aminoacides individuels utilisés pour la synthèse 20 du peptide et inclus dans la structure de peptide, y compris la m-di-(2-chloroéthyl)-amino-phénylalanine, doivent être à configuration L,

2) les séquences de peptides bien définies suivantes, reliés par un groupe méthylène à la fonction carboxamide de 25 la tétracycline, sont établies :

- a) p-fluoro-L-phénylalanyl-L-aspartyl-m-di-(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanine,
- b) L-séryl-p-fluoro-L-phénylalanyl-m-di-(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanine,
- c) L-proyl-m-di-(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanyl-p-fluoro-L-phényl-alanine,
- d) N,ξ [m-di-(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanyl]-L-lysyl-L-norvaline,
- e) L-glutamyl-p-fluoro-L-phénylalanyl-glycyl-m-di-(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanine,
- f) p-fluoro-L-phénylalanyl-glycyl-m-di-(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanyl-L-norvaline.

La réaction de condensation entre la tétracycline et un stér d'un peptide en proportions stoechiométriques s'effec-

71 06426

tue à une températur appropriée et dans un milieu approprié, ordinairement de l'alcool t rt-butylique, en présence de la quantité appropriée d formaldéhyde. On isol les produits d réaction en refroidissant, puis en l s précipitant au moyen d'un solvant approprié (généralement de l'éther de pétrole), on les lave sur le filtre au moyen du même solvant et on sèche sous vide à 50°C. On soumet les composés ainsi préparés à une analyse élémentaire, à une détermination spectrophotométrique de la tétracycline et à une chromatographie sur couche mince avec un mélange de butanol, de méthanol et de solution aqueuse d'acide citrique à 10% (4:1:2). Détection ; KMnO<sub>4</sub> 0,1N.

On obtient selon l'invention les portions peptides de la molécule par la technique qui sert à la préparation des peptides, par exemple en effectuant la condensation entre le groupe carboxyle de l'un des aminoacides constituants et le groupe amine d'un autre aminoacide estérifié, en présence de dicyclohexylcarbodiimide. On utilise aussi des procédés utilisant des azides et des anhydrides N-carboxyliques. Afin de protéger sélectivement les groupes fonctionnels amino, on acylique le groupe amino lui-même par de l'acide formique ou du chlorure de carbobenzoxyle et, dans certains cas, on acylique au moyen de chlorure de trityle. On protège les groupes carboxyles en les estérifiant au moyen d'esters méthyliques, éthyliques, hexyliques ou benzyliques. Finalement, on élimine complètement ou partiellement les groupes de blocage par hydrogénolyse catalytique, par l'action de l'acide bromhydrique dans de l'acide acétique glacial ou de l'acide chlorhydrique dans de l'alcool éthylique et finalement par saponification. On effectue l'analyse élémentaire des composés individuels; on détermine séparément les atomes de chlore liés par des liaisons covalentes et ioniques (comme des chlorhydrates). On détermine la pureté du produit ainsi obtenu par chromatographie en couche mince sur du gel de silice G ainsi que par détermination de l'activité optique.

Diverses techniques de l'invention sont mieux illustrées par les exemples suivants. On évalue l'activité chimiothérapeutique des composés selon les méthodes établies par le CCNSC (Cancer Chemotherapy, National Service Center - U.S. Department of Health, Education and Welfare, Cancer Chemotherapy, rapport N° 25, Décembre 1962) en utilisant comme tumeur d'essai

le sarcome 180 ou l'adénocarcinome 755. La suivante est que la détermination du poids des tumeurs chez les souris traitées par les substances à l'essai chez les témoins s'effectue un jour plus tard qu'il n'est indiqué par le CCNSC; on 5 procède ainsi afin de permettre l'évaluation des globules blancs au cours du jour précédent et, par conséquent, on détermine l'hémotoxicité. Dans chaque expérience, on utilise comme étalon la m-di-(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanine à quatre niveaux de dosage en progression géométrique et on 10 administre aussi chaque composé à quatre doses correspondant à la teneur de celui-ci en m-di-(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanine. L'étalon aussi bien que les composés de l'invention n sont administrés par injection intrapéritonéale.

Les recherches chimiothérapeutiques indiquent que parmi 15 les nombreux composés essayés, ceux qui sont décrits par l'invention donnent des résultats particulièrement bons dans l'expérimentation pharmacologique et ont des possibilités favorables d'application thérapeutique dans certains cas d'affections néoplasiques humaines.

20 Les exemples non limitatifs ci-dessous illustrent les procédés de préparation des six composés de l'invention.

EXEMPLE I

N° 158/2

N-(p-F-L-Phé.-(β-OEt)-L-Asp.m-L-SL.OEt)CH<sub>2</sub>TC.2HCl

25 Dichlorhydrate de l'ester éthylique de tétracycline-méthylène-p-fluoro-L-phénylalanyl-(β-éthyl)-L-aspartyl-m-(di-(2-chloro-éthyl)-amino)-L-phénylalanine.

On dissout 4,45 g (0,01 mole) de tétracycline dans 100 ml d'alcool tert-butylique et on y ajoute 1,8 ml d'une solution 30 aqueuse de formaldéhyde à 40%.

On dissout 7,15 g (0,01 mole) de dichlorhydrate de l'ester éthylique de p-fluoro-L-phénylalanyl-(β-éthyl)-L-aspartyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine dans 300 ml d'alcool tert-butylique.

35 On chauffe séparément les deux solutions au point d'ébullition, puis on les mélange, on agite pendant environ 15 minutes et on laisse refroidir.

Au bout de 24 heures, on recueille par filtration la matière jaune qui s'est séparé, on la lave à l'alcool tert-butylque et on la séche dans un dessicateur.

	Calculé	Trouvé
TC, %	37,95	40,06
Cl, %	12,11	14,03

Synthèse du fragment peptide du composé 158/2

5 Dichlorhydrate de l'ester éthylique de p-fluoro-L-phénylalanyl-( $\beta$ -éthyl)-L-aspartyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine (VI).

a) Chlorhydrate du L-aspartate de  $\beta$ -éthyle (I).

Pour la synthèse de (I), voir Koch R.H., Hanson Z.,  
10 Phys. Chem. 292 180 (1953).

b) N-carbobenzoxy-L-aspartate de  $\beta$ -éthyle (II)

On dissout 13,8 g (0,07 mole) du chlorhydrate de L-aspartate d'éthyle dans 93 ml d'eau, on porte le pH à 5 au moyen de 23 ml de NaOH 3N et, immédiatement, on ajoute 5,9 g 15 (0,07 mole) de bicarbonate de sodium.

Après dissolution, on ajoute aussi 5,65 g (0,14 mole) d'oxyde de magnésium.

Après refroidissement à 0°C sous agitation, on ajoute au mélange 23,8 g (0,14 mole) de chlorure de carbobenzoxyde 20 par petites fractions en veillant à ce que la température ne dépasse pas 0°C.

On maintient le mélange sous agitation pendant 20 minutes supplémentaires environ, puis on filtre. On lave le filtrat avec 150 ml d'éther éthylique, puis on acidifie jusqu'à virage 25 du rouge Congo au moyen de HCl concentré.

On extrait à deux reprises par de l'éther éthylique le sirop qui s'est séparé; on réunit les solutions éthérées, on les lave avec 50 ml d'eau et on sèche sur du sulfate de sodium.

Après évaporation de l'éther, on obtient un résidu hui- 30 leux que l'on utilise pour la synthèse de (III).

c) Ester éthylique de N-carbobenzoxy-( $\beta$ -éthyl)-L-aspartyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine (III).

A une solution refroidie de 13,2 g (44,6 millimoles) de composé (II) et de 14,8 g (44,6 millimoles) d'ester éthylique 35 de m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine dans 160 ml de chloroforme, on ajoute 10,0 g (48,6 millimoles) de dicyclohexylcarbodiimide en agitant et en refroidissant extérieurement avec de la glace.

Après une nuit à la température ambiante, on élimine 40 par filtration la dicyclohexylurée qui a précipité; on lave le

filtrat à deux reprises au moyen d'acide acétique dilué, d'un solution saturé de bicarbonat de sodium, puis à l'eau.

Après séchage sur du sulfat de sodium et filtration, on évapore le solvant sous vide. On cristallise le résidu par 5 l'éthanol bouillant, ce qui donne un produit cristallin blanc, on le filtre, on le lave à l'éther éthylique et on le sèche à l'air. Rendement : 15 g;  $[\alpha]_D^{20} = +45,8^\circ$  (c = 2; chloroforme); point de fusion 99 à 101°C.

	calculé	Trouvé
10 N, %	6,88	6,72
Cl, %	11,62	11,72
d) Dichlorhydrate de l'ester éthylique de ( $\beta$ -éthyl)-L-aspartyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine (IV).		

On hydrogène catalytiquement un mélange contenant 3,8 g 15 (6,2 moles) de composé (III), 1 g de charbon de bois à 5% de palladium, 200 ml de méthanol et 10 ml d'acide acétique glacial.

Après avoir éliminé le catalyseur par filtration, on évapore le filtrat sous vide. On reprend le résidu par 10 ml d'HCl éthanolique à 5%, on dilue par 8 à 10 volumes d'éther éthylique anhydre ce qui donne un précipité, on le filtre, on le lave à l'éther et on le sèche sous vide sur de l'anhydride phosphorique et de la soude. Rendement 2,6 g;  $[\alpha]_D^{20} = 4,3$  (c = 1; acide chlorhydrique éthanolique 0,1N); point de fusion 63°C (décomposition).

25 e) Ester éthylique de N-formyl-p-fluoro-L-phénylalanyl-( $\beta$ -éthyl)-L-aspartyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine (V).

On ajoute 6,7 g (32,88/moles) de dicyclohexylcarbodiimide à un mélange de 14,24 g (29,89 millimoles) d'ester éthylique de ( $\beta$ -éthyl)-L-aspartyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine obtenu en traitant son dichlorhydrate (composé IV) par une solution aqueuse de carbonate de sodium, et de 6,3 g (29,89 millimoles) de N-formyl-p-fluoro-L-phénylalanine dans 150 ml de chloroforme avec refroidissement extérieur et agitation électromagnétique.

35 Au bout de 10 minutes environ, on interrompt le refroidissement et on maintient la solution à la température ambiant pendant 4 heures en agitant continuellement.

Si la masse se solidifie, on la chauffe au bain-mari avant de la filtrer et on extrait par du tétrahydrofurane 40 le produit retenu par la dicyclohexylurée précipitée.

71 06426

Le produit de réacti n est obtenu par évaporation de la solution d tétrahydrofurane et on l'ajoute au précipité obtenu à partir de la solution de chloroform que l'on réduit de moitié et que l'on maintient une nuit au réfrigérateur (4°C). On 5 met le reste de la solution chloroformée sur une colonne de gel de silice (0,05 à 0,2 mm), on élue par un mélange de chloroforme et de méthanol (19:1) et on recueille les fractions qui contiennent le produit réactionnel; après évaporation du solvant, on ajoute ce produit au produit précédent et on obtient 10 ainsi au total 14 g de produit brut.

On cristallise ce dernier à deux reprises par l'éthanol absolu et on le lave à l'alcool et à l'éther éthylique. Rendement 8,2 g (42%) après séchage à l'aide d'une lampe à infrarouge. Point de fusion 147 à 149°C;  $[\alpha]_D^{21} = +19,6$  (c=2; 15 chloroforme).

	Calculé	Trouvé
N, %	8,37	8,50
Cl, %	10,59	10,73
f) Dichlorhydrate de l'ester éthylique de p-fluoro-L-phényl-20 alanyl-(β-éthyl)-L-aspartyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine (VI).		

Dans un récipient protégé de l'humidité ambiante, on dissout 4 g (5,97 millimoles) du dérivé formylé préparé ci-dessus dans 40 ml d'HCl éthanolique à 5%.

25 Après une nuit de repos à la température ambiante, on élimine le solvant sous vide, on reprend le résidu par 20 ml d'éthanol et on évapore.

On dissout le résidu solide dans une petite quantité d'éthanol, on le précipite en diluant la solution par 10 à 15 volumes d'éther éthylique anhydre, on filtre, on lave à l'éther et on sèche sous vide sur  $P_2O_5$  et NaOH.  $[\alpha]_D^{22} = +2,0^\circ$  (c=2; HCl éthanolique 1N); point de fusion 95°C (décomposition). Rendement : 4,2 g (100%).

	Calculé	Trouvé
Cl, %	9,82	9,03
Cl, %	19,85	19,02
N, %	7,84	7,75

#### EXAMPLE II

N° 158/3

40 acétate de N-(L-Sér.p-F-L-Phe.m-L-SL-OEt).CH<sub>2</sub>.TC

Acétat d' l'ester éthylique de tétracycline-méthylén-L-séryl-p-fluoro-L-phényl-alanyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine.

On dissout 2,2 g (0,005 mole) de tétracycline dans 50 ml 5 d'alcool tert-butylique et on ajoute 0,5 ml d'une solution aqueuse de formaldéhyde à 40%.

On dissout 3,2 g (0,005 mole) d'acétate de l'ester éthylique de L-séryl-p-fluoro-L-phénylalanyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine dans 100 ml d'alcool tert-butylique.

10 On chauffe séparément les deux solutions au point d'ébullition, puis on les mélange et on agite vigoureusement pendant 10 minutes.

On laisse refroidir la solution puis on ajoute 300 ml d'éther de pétrole en agitant.

15 Il se sépare un précipité jaune, on le recueille et on le lave à l'éther de pétrole. Rendement : 2,8 g.

	Calculé	Trouvé
Tc, %	40,32	47,48
Cl, %	6,43	7,73

20 Synthèse du fragment peptide du composé 158/3

Acétate de l'ester éthylique de L-séryl-p-fluoro-L-phénylalanyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine.

a) Ester éthylique de N-formyl-p-fluoro-L-phénylalanyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine (I).

25 A une solution de 46,6 g (0,14 mole) d'ester éthylique de m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine dans 300 ml de tétrahydrofurane, on ajoute en agitant et en refroidissant extérieurement 29,6 g (0,14 mole) de N-formyl-p-fluoro-L-phénylalanine et 31,7 g (0,15 mole) de dicyclohexylcarbodiimide.

30 Au bout de 10 minutes, on interrompt le refroidissement et on poursuit l'agitation pendant 3 heures.

On élimine par filtration la dicyclohexylurée qui a précipité et on évapore le filtrat sous vide jusqu'à siccité.

On lave le résidu à l'éther et on le cristallise par 35 300 ml d'alcool à 95%; on obtient 52 g de paillettes de produit cristallisé qu'on lave à l'éther; point de fusion 126-127°C.

La liqueur mère et la solution éthérée du pr mi r lavag donnent, après évaporation sous vide et cristallisation répétée du résidu par l'alcool, 1,5 g d'un produit qui est semblable au précédent. Le rendement total est de 53,5 g (72,5%);

$[\alpha]_D^{22} = +21,7^\circ$  (c = 2; chloroforme).

	Calculé	Trouvé
N, %	7,98	8
Cl, %	13,47	13,2

5 On vérifie la pureté du produit par chromatographie en couche mince.

b) Chlorhydrate de l'ester éthylique de p-fluoro-L-phényl-alanyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine (II).

10 On dissout 40 g (76 millimoles) du composé (I) dans 200 ml d'HCl éthanolique à 5% en agitant de temps en temps et on conserve une nuit la solution obtenue dans un récipient clos.

On élimine le solvant par évaporation sous vide ( $40^\circ\text{C}$ ), on reprend le résidu par une petite quantité d'alcool et on évapore à nouveau.

15 Le résidu gommeux se solidifie lorsqu'on le dissout dans 100 ml d'alcool éthylique et que l'on dilue graduellement à l'éther (500 à 1000 ml).

On filtre le précipité, on le lave à l'éther et on le sèche brièvement sous vide sur  $\text{P}_2\text{O}_5$ , puis à l'air sous une lampe à infra-rouge; point de fusion  $170-172^\circ\text{C}$ ; rendement 35 g;  $[\alpha]_D^{21} = +18^\circ$  (c = 2, éthanol).

	Calculé	Trouvé
N, %	7,86	7,9
Cl, %	19,9	19,3
Cl <sup>-</sup> , %	6,6	6,7

c) N-carbobenzoxy-L-sérine (III)

On prépare la N-carbobenzoxy-L-sérine par la technique de Buttman et Boissonas (Helv. Chim. Acta 41, 1852, 1958).

d) Ester éthylique de N-carbobenzoxy-L-séryl-p-fluoro-L-phényl-alanyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine (IV).

30 A une solution de 15,7 g (29,35 millimoles) de (II) dans 90 ml de tétrahydrofurane on ajoute avec agitation, à la température ambiante, 3 g (29,4 millimoles) de triéthylamine (formation d'un précipité), 71,1 g (29,4 millimoles) de (III) et 6,6 g (32 millimoles) de dicyclohexylcarbodiimide, puis 30 ml de tétrahydrofurane.

35 Au bout de 4 heures, on sépare le précipité par filtration et on évapore le filtrat sous vide ( $40^\circ\text{C}$ ).

40 On lave d'abord à l'éther (60 ml) le résidu semi-solide et on le cristallise par 100 ml d'acétate d'éthyl (on filtr

à chaud la solution trouble).

Le précipité, lavé à l'acétate d'éthyl et à l'éther, pèse 14,2 g (63,3%); point de fusion : 158-160°C.  $[\alpha]_D^{21} = +17,9^\circ$  (c = 2; chloroforme).

	Calculé	Trouvé
5 N, %	7,79	7,84
Cl, %	9,85	9,8

On vérifie la pureté du produit par chromatographie.

e) Acétate de l'ester éthylique de L-séryl-p-fluoro-L-10 phénylalanyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine (V).

On hydrogène avec agitation à la température ambiante une suspension de 12,3 g (17,1 millimoles) de (IV) et de 2 g de charbon de bois à 5% de palladium dans un mélange de 250 ml d'alcool méthylique et 25 ml d'acide acétique.

15 Après cessation du dégagement de  $\text{CO}_2$  (au bout d'environ 1 heure) on continue l'hydrogénéation pendant une heure de plus; on effectue une filtration pour éliminer le catalyseur et on évapore le solvant sous vide (30 à 40°C) jusqu'à un volume réduit.

20 Quand on reprend lentement par l'éther (environ 1 volume) en agitant, il apparaît un précipité gélatineux.

Après avoir filtré soigneusement, on lave à l'éther et après une filtration supplémentaire, on sèche le produit sous une lampe à infra-rouge.

25 Rendement : 6,6 g; point de fusion 122-123°C.

En diluant la liqueur mère avec une quantité supplémentaire d'éther, on récupère 1,9 g de produit.

30 Rendement total : 8,5 g (77,2%);  $[\alpha]_D^{23} = +18,6^\circ$  (c = 2; acide acétique);  $[\alpha]_D^{23} = +4,0^\circ$  (c = 2; méthanol).  $\text{CH}_2\text{COOH}$  : 9,3% (calculé 9,3%).

	Calculé	Trouvé
N, %	8,68	8,64
Cl, %	11,0	11,3

On vérifie par chromatographie la pureté du produit.

### EXEMPLE III

N° 158/4

N-(L-Pro.m-L-SL.p-F-L-Phé.OEt.). $\text{CH}_2\text{COOH}$ .TCHCl

40 Chlorhydrate de l'ester éthylique de tétracycline-méthylène-L-propyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanyl-p-fluoro-L-phénylalanine.

On dissout 2,8 g (0,0063 mol) de tétracycline dans 100 ml d'alcool t rt-butylique et on y ajoute 0,6 ml d'une solution aqueuse à 40% de formaldéhyde.

On dissout 4 g (0,0063 mole) d'chlorhydrate de l'estér 5 éthylique de L-propyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phényl-alanyl-p-fluoro-L-phénylalanine dans 300 ml d'alcool tert-butylique.

On chauffe séparément les deux solutions au point d'ébullition puis on les mélange et on agite pendant 10 minutes.

10 Par refroidissement, il se sépare un précipité jaune, on le recueille, on le lave à l'alcool tert-butylique puis à l'éther éthylique anhydre. Rendement : 3 g.

	Calculé	Trouvé
Tc, %	40,83	42,51
15 Cl, %	9,77	9,56

Synthèse du fragment peptide du composé 158/4

Chlorhydrate de l'estér éthylique de la L-propyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanyl-p-fluoro-L-phénylalanine.

a) N-carbobenzoxy-L-prolyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine (I).

À une solution de 40 g (0,12 mole) d'estér éthylique de m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine dans 300 ml de chloroforme, on ajoute 29,9 g (0,12 mole) de N-carbobenzoxy-L-proline (Berger, A. Kurtz, J.E. Katchalski, J.A.C.S. 76, 5552, 25 1954) dissous dans 60 ml de chloroforme, puis 27 g de dicyclohexylcarbodiimide (0,13 mole). On laisse la solution obtenue à la température ambiante (environ 20°C) pendant 3 heures tout en agitant.

On élimine par filtration la dicyclohexylurée formée 30 (14 g) et on la jette.

On concentre la solution sous vide jusqu'à évaporation complète du solvant. On met le résidu huileux obtenu sur une colonne contenant du gel de silice C et on élue avec un mélange chloroforme-acétone (9:1).

35 Le produit purifié, l'estér éthylique de N-carbobenzoxy-L-prolyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine, initialement huileux, se solidifie après repos sous une couche d'éther de pétrole. Rendement 45,9 g.

On traite le produit obtenu, dans un solution aqueuse 40 d'acéton, par la quantité stoechiométrique de NaOH, 1N pen-

dant 1 heure à la température ambiante et ensuite on neutralise la NaOH par du HCl, 1N.

Après élimination de l'acétone, on extrait le produit huileux par du chloroforme, on jette la couche aqueuse et on 5 déshydrate la couche organique sur du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

On titre la solution du dérivé carbobenzoxylé et on l'utilise pour la synthèse de (II).

b) Chlorhydrate de l'ester éthylique de L-proyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanyl-p-fluoro-L-phénylalanine (II).

10 A une solution de 23,7 g (44,2 millimoles) de (I) dans 130 ml de chloroforme, on ajoute une solution de 9,3 g (44,2 millimoles) d'ester éthylique de p-fluoro-L-phénylalanine dans 200 ml de chloroforme et 10,3 g (50 millimoles) de di-cyclohexylcarbodiimide.

15 Après avoir agité pendant 4 heures et avoir laissé reposer une nuit à la température ambiante, on élimine par filtration la dicyclohexylurée.

Après avoir séché et repris par l'éther anhydre, on obtient une solution; il ne reste que les derniers résidus de 20 dicyclohexylurée et on les filtre rapidement.

On tire du filtrat un abondant précipité du tripeptide (17 g).

Elimination du groupe carbobenzoxyle.

On dissout par chauffage 15 g de l'ester éthylique de 25 N-carbobenzoxy-L-proyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanyl-p-fluoro-L-phénylalanine dans 10 volumes d'HCl à 5% dans de l'alcool éthylique absolu et on hydrogène en présence d'environ 2 g de charbon de bois palladié pour compléter l'élimination de  $\text{CO}_2$ . On filtre le palladium sous vide; après 30 avoir concentré jusqu'à siccité et avoir repris trois fois par de l'alcool éthylique absolu, on cristallise le résidu par l'alcool.

Rendement : 11,4 g de chlorhydrate de tripeptide qui se décomposé au-dessus de 95°C et qui est pur à l'analyse chromatographique.  $[\alpha]_D^{20} = -13,86^\circ$  (c = 1; alcool méthylique).

	Calculé	Trouvé
N, %	8,86	8,9
Cl <sup>-</sup> , %	5,61	5,62
Cl, %	16,83	16,90

EXEMPLE IV

N° 158/5

N,N'-(N(m-L-SL)-L-Lys.OEt.) (CH<sub>2</sub>.TC)<sub>2</sub>.3HClTrichlorhydrate de l'ester éthylique de tétracycline-diméthylène-N- $\xi$  (m-di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanyl-L-lysine.

On dissout 4,4 g (0,01 mole) de tétracycline dans 100 ml d'alcool tert-butylique et on y ajoute 1 ml d'une solution aqueuse à 40% de formaldéhyde.

On dissout 2,8 g (0,005 mole) de trichlorhydrate de l'ester éthylique de N- $\xi$  (m-di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanyl-L-lysine dans 100 ml d'alcool tert-butylique.

On chauffe séparément les deux solutions au point d'ébullition, puis on les mélange par agitation pendant 10 minutes et on laisse refroidir.

Au refroidissement, il se sépare un précipité jaune, on le recueille, on le lave à l'alcool tert-butylique et à l'éther éthylique anhydre et on sèche. Rendement : 4,5 g.

	Calculé	Trouvé
Tc, %	59,91	56,72
Cl, %	11,95	11,94

Synthèse du fragment peptide du composé 158/5Trichlorhydrate de l'ester éthylique de N- $\xi$ -(m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanyl)-L-lysine.

a) Ester éthylique de N- $\xi$ -(N-carbobenzoxy-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phényl-alanyl)-N- $\alpha$ -formyl-L-lysine (I).

On forme le composé (I) selon le mode opératoire suivant.

On ajoute en agitant 12,4 ml de tributylamine à une solution de 22 g de N-carbobenzoxy-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine dans 200 ml de chloroforme, refroidie à 0°C.

Ensuite, on ajoute goutte à goutte 6,9 ml de chlorocarbonate d'isobutyle; on maintient cette solution à 0°C en agitant pendant 3 heures.

Puis on ajoute 100 ml d'une solution de 10,1 g (0,05 mole) d'ester éthylique de N- $\alpha$ -formyl-L-lysine dans du chloroforme.

Au bout de 2 heures à 5°C, on lave la solution résultante à l'eau, on la sèche sur du sulfate de sodium et on évapore sous vide pour compléter l'élimination du solvant.

Le rendement n composé (I) est de 20,5 g;

$[\alpha]_D^{20} = +12,9^\circ$  (c = 2; CHCl<sub>3</sub>).

b) Est r éthylique de N- $\epsilon$ -(m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanyl)-N- $\alpha$ -formyl-L-lysine (II).

On forme 1 composé II selon 1 mode opératoire suivant.

On ajoute 2 g de charbon de bois à 5% de palladium à une suspension de 20,5 g de composé (I) dans 200 ml d'alcool éthylique absolu.

On hydrogène la suspension obtenue jusqu'à ce que le dégagement de  $\text{CO}_2$  cesse (20 heures).

On filtre la solution obtenue pour éliminer le charbon de bois palladié et on élimine le solvant; il reste un produit huileux (II).

c) Trichlorhydrate de l'ester éthylique de N- $\epsilon$ -(m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanyl)-L-lysine (III).

On forme le composé (III) selon le mode opératoire suivant. On reprend la substance huileuse (II) par 200 ml d'HCl à 5% dans l'alcool éthylique absolu et on laisse à la température ambiante (environ 20°C) pendant environ 18 heures. Après évaporation du solvant sous vide, on reprend le résidu par de l'éther éthylique anhydre, puis on évapore l'éther. Rendement 20 17,7 g.  $[\alpha]_D^{20} = +25^\circ$  ( $c = 2$ ; HCl, N/10 dans l'alcool éthylique).

	Calculé	Trouvé
N, %	9,81	9,71
Cl <sup>-</sup> , %	18,63	18,04
Cl, %	31,06	29,96

25

#### EXEMPLE V

N° 164

N-[ $\epsilon$ -( $\delta$ -OEt.)-L-Glu-p-F-L-Phé.Gly.m-L-SL.OEt.]CH<sub>2</sub>.TC.2HCl

Dichlorhydrate de l'ester éthylique de tétracycline-méthylène-( $\delta$ -éthyl)-L-glutamyl-p-fluoro-L-phénylalanyl-glycyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine.

On dissout 3,1 g (0,007 mole) de tétracycline dans 70 ml d'alcool tert-butylique et on y ajoute 0,8 ml d'une solution aqueuse à 40% de formaldéhyde.

On dissout 3,9 g (0,007 mole) de dichlorhydrate de 35 l'ester éthylique de ( $\delta$ -éthyl)-L-glutamyl-p-fluoro-L-phénylalanyl-glycyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine dans 70 ml d'alcool tert-butylique.

On chauffe séparément les deux solutions au point d'ébullition, puis on les mélange en agitant pendant 10 minutes et 40 on laisse refroidir.

Au r froidissement, il se sépare un précipité jaune; on le recueille, on le lave à l'alcool tert-butylique et à l'éther éthylique anhydre et on sèche. Rendement 4,3 g.

	Calculé	Trouvé
5 TC, %	43,92	45,29
Cl, %	7	7,15

Synthèse du fragment peptide du composé 164

Dichlorhydrate de l'ester éthylique de ( $\delta$ -éthyl)-L-glutamyl-p-fluoro-L-phénylalanyl-glycyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine (IV).

a) Ester éthylique de glycyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine (I).

On met en suspension 5,15 g (0,05 mole) de N-formal-glycine dans 50 ml de chloroforme. A cette suspension, on ajoute 15 200 ml d'une solution de 16,6 g (0,05 mole) d'ester éthylique de m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine dans du chloroforme.

Après dissolution, on ajoute à la solution à 10°C, en agitant, 10,3 g (0,05 mole) de dicyclohexylcarbodiimide dissous dans 100 ml de chloroforme.

20 Il se sépare de la dicyclohexylurée qu'on élimine par filtration au bout d'une nuit et on concentre le filtrat jusqu'à siccité; on cristallise le résidu par de l'alcool éthylique et on obtient ainsi 16 g de produit purifié, point de fusion 122-124°C.  $[\alpha]_D^{20} = +43^\circ$  (c = 2; chloroforme).

25 Elimination du groupe formyle

On dissout à la température ambiante 13,5 g (0,032 mole) d'ester éthylique de N-formylglycyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine dans 250 ml d'HCl à 5% dans l'alcool éthylique absolu.

30 Au bout d'une nuit à la température ambiante, on élimine le solvant sous vide, on reprend le résidu par de l'eau, on y ajoute une solution saturée de bicarbonate de sodium et on extrait par le chloroforme (200 ml).

Après avoir titré la solution de dipeptide (I) dans du 35 chloroforme, on l'utilise pour la synthèse du tripeptide (II).

b) Ester éthylique de p-fluoro-L-phénylalanyl-glycyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine (II).

40 A une solution (200 ml) de 13,5 g (0,0347 mole) de composé (I) dans du chloroform, on ajoute 11,0 g (0,0347 mole) de N-carbobenzoxy-p-fluoro-L-phénylalanine à la température ambiante.

On refroidit à 5°C la solution obtenu et on y ajout un s lution de 7,8 g (0,038 mole) de dicyclohexylcarbodiimide dans 100 ml de chloroforme.

Au bout de 3 heures à la température ambiante, on élimin 5 par filtration la dicyclohexylurée séparée, on élimine le solvant du filtrat et on cristallise le résidu solide par 250 ml de méthanol; on obtient ainsi du N-carbobenzoxytripeptide; rendement 17,5 g; point de fusion 148-149°C,  $[\alpha]_D^{20} = +26,6^\circ$  (c = 2; chloroforme).

#### 10 ELimination du groupe carbobenzoyle

On dissout lentement 20 g du carbobenzoxytripeptide dans 25 ml d'une solution à 40% de HBr dans de l'acide acétique glacial. Au bout d'une heure, on verse la solution obtenue dans 200 ml d'éther éthylique anhydre. On recueille sur le 15 filtre le précipité (bromhydrate de tripeptide) et on le lav à l'éther. On traite le produit par une solution saturée de carbonate de sodium et de chloroforme pour éliminer le HBr.

La solution dans le chloroforme contient l'ester éthylique de tripeptide (II). Après titrage de la solution du tripeptide dans le chloroforme, on l'utilise pour la synthèse 20 du térapeptide (IV).

#### c) N-carbobenzoxy-L-glutamate de $\gamma$ -éthyle (III).

On prépare cet ester selon la méthode de Hegedus (Helv. Chim. Acta 31, 737 (1948)).

25 d) Dichlorhydrate de l'ester éthylique de ( $\gamma$ -éthyl)-L-glutamyl-p-fluoro-L-phénylalanyl-glycyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine (IV).

A une solution de 22,2 g (0,040 mole) de l'ester éthylique de tripeptide (composé II) et de 12,3 g (0,04 mole) de 30 N-carbobenzoxy-L-glutamate de  $\gamma$ -éthyle (III) dans 300 ml de chloroforme, on ajoute une solution de 9 g (0,044 mole) de dicyclohexylcarbodiimide dans 200 ml de chloroforme à +5°C.

Après 3 heures de repos à la température ambiante, il 35 se sépare de la dicyclohexylurée qu'on élimine par filtration, puis l'on chasse le solvant du filtrat.

On cristallise le résidu par de l'alcool éthylique absolu et on obtient ainsi 17 g de produit (dérivé carbobenzoxylé), point de fusion 160-162°C.  $[\alpha]_D^{20} = -16,3^\circ$  (c = 1; alcool méthylique).

	Calculé	Trouvé
N, %	8,27	8,28
Cl, %	8,37	8,40

Elimination du groupe carbobenzoxyle

5 On soumet à l'hydrogénolyse pendant 6 à 7 heures un mélange de 15 g (0,017 mole) de N-carbobenzoxytétrapeptide, de 1 g de catalyseur noir de palladium et de 200 ml d'une solution d'HCl 0,1N dans l'alcool méthylique.

10 Après achèvement de l'hydrogénolyse, on récupère le palladium par filtration, on concentre le filtrat jusqu'à un volume réduit et on ajoute une petite quantité d'éther.

15 Le dichlorhydrate de tétrapeptide (IV) précipite et on le recueille sur un filtre. Rendement : 11 g; point de fusion 100°C (décomposition);  $[\alpha]_D^{20} = +7,1^\circ$  (c = 0,9; HCl 0,1N dans 1' éthanol).

	Calculé	Trouvé
N, %	8,91	8,87
Cl, %	18,05	18,10
Cl <sup>-</sup> , %	9,03	8,95

20 EXEMPLE VI

N° 165

N-(p-F-L-Phé.Gly.m-L-SL.L-Norval.OEt).CH<sub>2</sub>.Tc.HCl

25 Chlorhydrate de l'ester éthylique de tétracycline-méthylène-p-fluoro-L-phénylalanyl-glycyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanyl-L-norvaline.

On dissout 3,2 g (0,0072 mole) de tétracycline dans 200 ml d'alcool tert-butylique et on y ajoute 0,7 ml d'une solution aqueuse à 40% de formaldéhyde. On dissout 5 g (0,0072 mole) d'ester éthylique de p-fluoro-L-phénylalanyl-glycyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanyl-L-norvaline dans 100 ml 30 d'alcool tert-butylique.

On chauffe séparément les deux solutions au point d'ébullition, puis on les mélange en agitant pendant 10 minutes et on laisse refroidir.

35 Au refroidissement, il se sépare un précipité jaune, on le recueille, on le lave à l'alcool tert-butylique et à l'éther éthylique anhydre et on le sèche. Rendement : 3 g.

	Calculé	Trouvé
Tc, %	38,73	42,5
Cl, %	9,27	8,97

Synthèse du fragment peptide du composé 165

Chlorhydrate de l'ester éthylique de p-fluoro-L-phénylalanyl-glycyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanyl-L-norvaline (F).

5 On forme de l'ester éthylique de N-carbobenzoxy-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanyl-L-norvaline (A).

On ajoute 20,6 g (0,1 mole) de dicyclohexylcarbodiimide dans 50 ml de chloroforme à une solution contenant 14,5 g (0,1 mole) de L-norvalinate d'éthyle et 43,90 g (0,1 mole) de 10 N-carbobenzoxy-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine dans 150 ml de chloroforme à 20°C.

Au bout de 3 heures, on élimine par filtration la dicyclohexylurée formée et on évapore le filtrat jusqu'à élimination complète du solvant. On reprend le résidu par de l'éther 15 éthylique anhydre et on évapore ensuite l'éther. Rendement en (A) : 50 g.

Élimination du groupe carbobenzoyle

On traite, sous agitation, 50 g de produit (A) par 100 ml d'une solution saturée d'acide bromhydrique dans l'acide acétique 20 que et on maintient sous agitation pendant 3 heures à la température ambiante (environ 20°C). Ensuite, on insolubilise le bromhydrate en versant la solution dans de l'éther éthylique anhydre.

On obtient la base en dissolvant le bromhydrate dans d 25 l'eau, en la neutralisant par une solution saturée de bicarbonate de sodium, puis en extrayant la base par le chloroforme (200 ml). La solution chloroformée, titrée par l'acide perchlorique dans l'acide acétique, contient 0,075 mole de dipeptide (B).

30 On prépare l'ester éthylique de N-carbobenzoxy-glycyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanyl-L-norvaline (C) par le mode opératoire suivant : A 20°C, on ajoute avec agitation 15,5 g (0,075 mole) de dicyclohexylcarbodiimide dans 50 ml de chloroforme à 200 ml d'une solution contenant, dans du 35 chloroforme, 0,075 mole de dipeptide (B) et 15,7 g (0,075 mol) de N-carbobenzoxyglycine. La réaction qui s'ensuit dure environ 3 heures.

Après avoir éliminé par filtration la dicyclohexylurée formé qui s'est séparée de la solution, on évapore le filtrat pour compléter l'élimination du solvant.

On reprend le produit huileux (D) par de l'éther éthylique anhydre. Le rendement est de 45 g.

Elimination du groupe carbobenzoxyle

On traite 40 g de produit (C) par 100 ml d'acide bromhydrique dans l'acide acétique et on maintient le mélange à la température ambiante avec agitation pendant 3 heures. Ensuite, on insolabilise le bromhydrate en versant la solution dans de l'éther éthylique anhydre. On obtient la base en dissolvant le bromhydrate dans de l'eau, en traitant par une solution saturée de bicarbonate de sodium et en extrayant par le chloroforme (200 ml).

On sèche la solution sur du sulfate de sodium et on la titre par de l'acide perchlorique dans de l'acide acétique. Elle contient 0,05 mole de tripeptide (D).

On prépare alors l'ester éthylique de N-formyl-p-fluoro-L-phénylalanyl-glycyl-m-(di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanyl-L-norvaline (E). On ajoute en agitant, à la température ambiante, 10,3 g (0,05 mole) de dicyclohexylcarbodiimide dans 100 ml de tétrahydrofurane à une solution contenant 0,05 mole de tripeptide (D) et 10,5 g (0,05 mole) de N-formyl-p-fluoro-L-phénylalanine dans 500 ml de tétrahydrofurane.

On continue la réaction pendant 4 heures. Après filtration et élimination de la dicyclohexylurée formée, on évapore le filtrat et on reprend le résidu par de l'éther éthylique anhydre. On évapore alors l'éther. Le rendement en produit (E) est de 25 g.

Elimination du groupe formyle

On dissout 17 g de composé (E) dans 250 ml d'HCl à 5% dans l'alcool éthylique et on laisse reposer 18 heures à la température ambiante.

Le produit cristallise spontanément de la solution. On effectue la filtration du produit et on le lave, d'abord avec une petite quantité d'alcool froid et ensuite avec de l'éther éthylique anhydre. Le rendement en produit (F) ci-dessus est de 15 g;  $[\alpha]_D^{20} = +39,6^\circ$  (c = 1,5; HCl à 5% dans l'alcool éthylique).

	Calculé	Trouvé
N, %	10,13	9,92
Cl <sup>-</sup> , %	5,13	5,13
40 Cl, %	15,39	14,89

Essais

On a effectué des essais chimiothérapeutiques selon le mode opératoire mentionné plus haut. En outre, on a fait apparaître les différences dans le spectre d'activité antitumorale des différents composés par des expériences biochimiques et des essais de culture in vitro. Pour les usages thérapeutiques, on considère qu'au lieu d'utiliser un seul composé, il est avantageux d'utiliser un mélange des composés mentionnés plus haut (numérotés 158/2, 158/3, 158/4, 158/5, 164, 165) à des doses équilibrées de manière à avoir 32 mg de m-di-(2-chloroéthyl)-amino)-L-phénylalanine au total dans une seule dose. La composition du mélange est la suivante :

158/2 : 21,2 mg - 158/3 : 14,5 mg - 158/4 : 21,4 mg -

158/5 : 19,5 mg - 164 : 16,4 mg - 165 : 30 mg.

15 Etant donné la difficulté de prédire la sensibilité d'un tumeur particulière à un composé défini, une composition comprenant plusieurs composés distincts de la même famille, mais ayant des sélectivités différentes, augmente la probabilité d'un effet thérapeutique favorable en élargissant le spectre 20 antitumoral.

Des exemples de recherches chimiothérapeutiques sont indiqués aux tableaux suivants.

TABLEAU 1

Effet antitumoral de certains esters éthyliques de tétracycline-méthylène-peptides essayés sur le sarcome 180. Animaux : souris, 6 à 8 par groupe. Le traitement commence 24 heures après l'implantation. Doses en progression géométrique. Une dose par jour pendant 7 jours. Doses exprimées en mg de m-di-(2-chloroéthyl)-amino-L-phénylalanine contenue dans les composés injectés. Animaux sacrifiés le 9ème jour. Poids des tumeurs des animaux d'essai comparés à celles des témoins. Résultats exprimés en pourcentage de diminution du poids des tumeurs chez les animaux traités, en comparaison des témoins.

S.C. = injection sous-cutanée - i.p. = intrapéritonéale - or = traitement oral

Composés	mg/kg de morts/ poids total	taux de morts/ tumeurs	carcasse rate	leucocytes
N-(p- <i>FPhe</i> .Asp.m-SL.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC.2HCl 1.p. 2,8	0/6	40,79	15,19	56,76
N-(p- <i>FPhe</i> .Asp.m-SL.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC.2HCl 1.p. 4	0/6	58,23	21,41	65,95
N-(p- <i>FPhe</i> .Asp.m-SL.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC.2HCl 1.p. 5,6	0/6	72,00	25,79	76,76
N-(p- <i>FPhe</i> .Asp.m-SL.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC.2HCl 1.p. 7,84	1/6	80,65	23,55	78,38
N-(Pro-m-L-SL.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC.2HCl	8.c. 2,8	0/6	0,08	+7,8
N-(Pro-m-L-SL.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC.2HCl	8.c. 5,6	0/6	51,40	4,80
N-(Pro-m-L-SL.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC.2HCl	8.c. 7,84	0/6	69,18	13,42
N-(Pro-m-L-SL.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC.2HCl	8.c. 10,98	0/6	79,20	18,70
N-(Pro-m-L-SL.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC.2HCl	or. 2	0/6	47,91	+4,7
N-(Pro-m-L-SL.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC.2HCl	or. 2,8	0/6	61,99	+2,1
N-(Pro-m-L-SL.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC.2HCl	or. 5,6	1/6	91,56	11,12
N-(Pro-m-L-ST.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC.2HCl	or. 7,84	0/6	92,11	26,62
N-(Pro-m-L-ST.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC.2HCl	or. 7,84	0/6	88,99	83,93
N-(p- <i>FPhe</i> .Gly.m-SL.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC	or. 3	0/8	73,18	5,15
N-(p- <i>FPhe</i> .Gly.m-SL.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC	or. 9	0/8	88,67	20,21
N-(p- <i>FPhe</i> .Gly.m-SL.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC	1.p. 3	1/8	85,50	9,08
N-(p- <i>FPhe</i> .Gly.m-SL.OEt)-CH <sub>2</sub> -TC	1.p. 9	4/8	98,74	32,10
				87,68
				64,65

TABLEAU 1 (suite)

Composés	Doses, mg/kg de morts/ poids	Mortalité % d'inhibition des tumeurs	% de diminution dans carcasse	rate	leucocytes	total
N-(Phe.Gly.m-SL.Lys.OEt)-CH <sub>2</sub> -TO	1.p. 2,8	0/8	41,68	7,58	48,44	25,23
N-(Phe.Gly.m-SL.Lys.OEt)-OH <sub>2</sub> -TO	1.p. 5,6	4/8	81,49	24,64	81,33	
N-(Phe.Gly.m-SL.Lys.OEt)-OH <sub>2</sub> -TO	1.p. 10,98	8/8				
N-N'-(Phe.Gly.m-SL.Lys.OEt)-(OH <sub>2</sub> -TO) <sub>2</sub>	1.p. 2	0/20	32,30	5,62	50,20	
N-N'-(Phe.Gly.m-SL.Lys.OEt)-(OH <sub>2</sub> -TO) <sub>2</sub>	1.p. 2,80	3/28	63,65	15,60	72,49	69,80
N-N'-(Phe.Gly.m-SL.Lys.OEt)-(CH <sub>2</sub> -TO) <sub>2</sub>	1.p. 4	0/20	78,08	20,39	80,92	70,10
N-N'-(Phe.Gly.m-SL.Lys.OEt)-(CH <sub>2</sub> -TO) <sub>2</sub>	1.p. 5,6	10/20	85,04	21,21	86,18	
N-N'-(Phe.Gly.m-SL.Lys.OEt)-(CH <sub>2</sub> -TO) <sub>2</sub>	1.p. 10,98	8/8				
N-N'-(Phe.Gly.m-SL.Lys.OEt)-(CH <sub>2</sub> -TO) <sub>2</sub>	s.c. 2,8	0/6	43,29	0,7	62,96	
N-N'-(Phe.Gly.m-SL.Lys.OEt)-(CH <sub>2</sub> -TO) <sub>2</sub>	s.c. 5,6	0/6	76,80	14,97	80,60	69,10
N-N'-(Phe.Gly.m-SL.Lys.OEt)-(CH <sub>2</sub> -TO) <sub>2</sub>	s.c. 7,84	0/6	86,67	21,21	88,42	
N-N'-(Phe.Gly.m-SL.Lys.OEt)-(CH <sub>2</sub> -TO) <sub>2</sub>	s.c. 10,98	2/6	94,06	26,76	92,13	
N-N'-(Phe.Gly.m-SL.Lys.OEt)-(CH <sub>2</sub> -TO) <sub>2</sub>	s.c. 2,8	0/12	67,41	14,69	68,59	
N-N'-(Phe.Gly.m-SL.Lys.OEt)-(CH <sub>2</sub> -TO) <sub>2</sub>	s.c. 5,6	8/12	95,60	30,82	89,53	89,24

23

71 06426

71 06426

24

2101226

TABLEAU 2

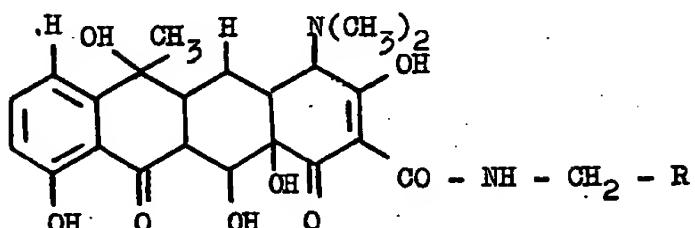
Effet antitumoral d'un mélange de composés 158/2 - 158/3 - 158/4 - 158/5 - 164 - 165.  
 Procédé d'expérimentation et composition du mélange comme décrit plus haut.

Doses (mg/kg m-L-SL)	Mortalité morts/total	% d'inhibition			% de diminution dans les tumeurs	carcasse	rate	leucocytes
		des tumeurs	carcasse	rate				
2,8	0/6	46,05	10,84	52,97				
4,0	0/6	77,07	15,81	77,30	63,11			
5,6	0/6	86,78	21,63	85,95				
7,84	1/6	93,51	21,83	86,49				

REVENDICATIONS

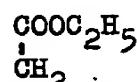
1. Composés répondant à la formule général :

5



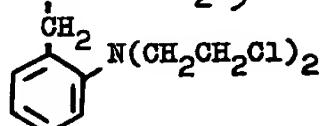
dans laquelle

10

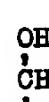


R = -NH - CH - CO - NH - CH - CO - NH - CH - COOC2H5,

15

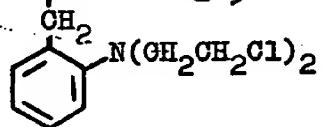


20

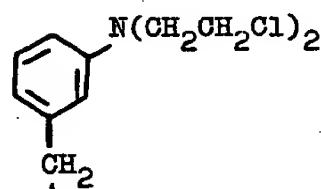
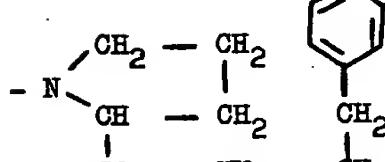


- NH - CH - CO - NH - CH - CO - NH - CH - COOC2H5,

25



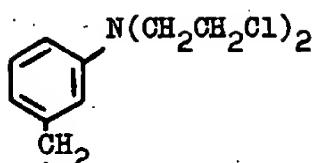
30



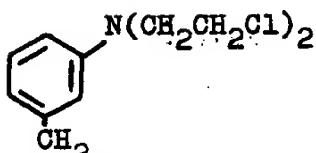
- CO - NH - CH - CO - NH - CH - COOC2H5,

35

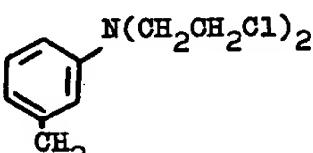




$$5 - \text{NH} - \overset{\text{CH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}} - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_4 - \overset{\text{CH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}} - \text{CO} - \text{NH} - \overset{\text{CH}}{\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}} - \text{COOC}_2\text{H}_5,$$



10  cu



20



2. Composé selon la revendication 1, contenant dans le fragment peptide la séquence : ester éthylique de p-fluoro-L-phénylalanyl-L-aspartyl.m-[di-(2-chloroéthyl)-amino]-L-phényl-  
30 alanine.

3. Composé selon la revendication 1, contenant dans le fragment peptide la séquence : ester éthylique de L-séryl-p-fluoro-L-phénylalanyl-m-[di-(2-chloroéthyl)-amino]-L-phénylalanine.

35 4. Composé selon la revendication 1, contenant dans le fragment peptide la séquence : est r éthylique d L-propyl-m-[di-(2-chloroéthyl)-amino]-L-phénylalanyl-p-fluoro-L-phénylalanin .

5. Composé selon la revendication 1, contenant dans 1

71 06426

fragment peptide la séquence : ster éthylique de N,{<sub>m</sub>-di-[(2-chloroéthyl)-amino]-L-phénylalanyl}-L-lysyl.L-norvalin .

6. Composé selon la revendication 1, contenant dans le fragment peptide la séquence : ester éthylique de L-glutamyl.p-5 fluoro.L-phénylalanyl-glycyl.m-[di-(2-chloroéthyl)-amino]-L-phénylalanine .

7. Composé selon la revendication 1, contenant dans le fragment peptide la séquence : ester éthylique de p-fluor-10 L-phénylalanyl.glycyl.m-[di-(2-chloroéthyl)-amino]-L-phénylalanyl-L-norvaline .

8. Composition pharmaceutique contenant, à titre d'ingrédient actif, au moins un composé selon la revendication 1 en une quantité efficace .

9. Composition pharmaceutique contenant un mélange 15 de composés de la formule générale selon la revendication 1 .

10. Composition pharmaceutique contenant un mélange de composés comportant les séquences de peptides : ester éthylique de p-fluoro-L-phénylalanyl-L-aspartyl.m-[di-(2-chloroéthyl)-amino]-L-phénylalanine; ester éthylique de L-séryl.p-20 fluoro-L-phénylalanyl.m-[di-(2-chloroéthyl)-amino]-L-phénylalanine; ester éthylique de L-prolyl.m-[di-(2-chloroéthyl)-amino]-L-phényl-alanyl-p-fluoro.L-phénylalanine; ester éthylique de N,{<sub>m</sub>-di-[(2-chloroéthyl)-amino]-L-phénylalanyl}-L-lysyl-L-norvaline; ester éthylique de L-glutamyl.p-fluoro-L-25 phénylalanyl-glycyl.m-[di-(2-chloroéthyl)-amino]-L-phénylalanine; ester éthylique de p-fluoro-L-phénylalanyl.glycyl.m-[di-(2-chloroéthyl)-amino]-L-phénylalanyl-L-norvaline .